

⑫ 公開特許公報 (A)

昭61-205484

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和61年(1986)9月11日

C 12 N 15/00
 // C 12 P 19/54
 (C 12 N 15/00
 C 12 R 1:545)

7115-4B
 8515-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑤4 発明の名称 新規プラスミド

②1 特 願 昭60-45760

②2 出 願 昭60(1985)3月9日

特許法第30条第1項適用 昭和59年10月1日、社団法人日本醸酵工学会発行の「昭和59年度日本醸酵工学会大会講演要旨集」により発表

⑦2 発 明 者 合 葉 修 一 吹田市山田西3丁目21, A712
 ⑦2 発 明 者 今 中 忠 行 吹田市山田西3丁目33A205
 ⑦2 発 明 者 大 貫 哲 男 箕面市小野原286 セブンハイッ笹川102号
 ⑦2 発 明 者 西 田 佐 知 子 大阪市生野区小路3-2-24
 ⑦1 出 願 人 三 榮 株 式 会 社 東京都中央区京橋1丁目15番1号

明 細 書

1. 発明の名称

新規プラスミド

2. 特許請求の範囲

1. ストレプトマイシンの生合成に参与するアミディノトランスフェラーゼ遺伝子を含有することを特徴とする組換えプラスミド。

2. アミディノトランスフェラーゼ遺伝子がストレプトマイシンの生産能を有する微生物の染色体 DNA に由来する特許請求の範囲第1項記載の組換えプラスミド。

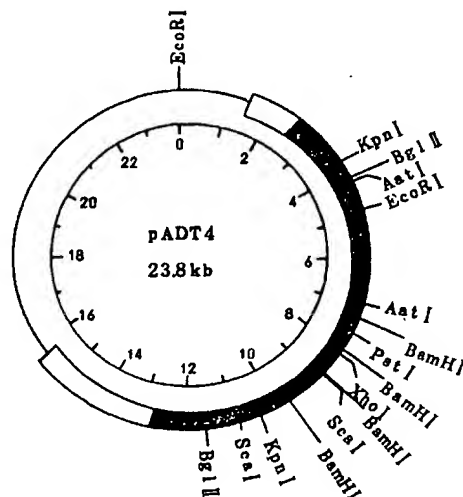
3. ストレプトマイシンの生産能を有する微生物がストレプトミセス・グリセウス ATCC 10137 である特許請求の範囲第2項記載の組換えプラスミド。

4. ベクタープラスミドが放線菌の属に属する微生物で自律増殖可能で宿主細胞の分裂に際して安定に娘細胞に受け継がれていく安定保持性に優れたプラスミドを用いた特許請求の範囲第1項から第3項記載のいずれかの組換えプラスミド。

5. ベクタープラスミドがプラスミド pOA15 に由来する特許請求の範囲第4項記載の組換えプラスミド。

6. プラスミド pOA15 に由来するベクタープラスミドがテトラサイクリン耐性遺伝子を有する pOA 154 である特許請求の範囲第5項記載の組換えプラスミド。

7. 次の制限酵素地図



で特徴づけられる特許請求の範囲第6項記載の組換えプラスミド。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、新規な組換えプラスミドに関し、更に詳しくはストレプトマイシンの生合成に関与するアミディノトランスフェラーゼ（以下、「ATase」と称する）遺伝子を含有することを特徴とする組換えプラスミドに関する。

従来の技術

組換えプラスミドの研究分野では、宿主として主に大腸菌及び枯草菌が使用され、インシュリンやインターフェロンなどの有用ペプチドまたは蛋白の微生物による生産が可能になってきた。

他方、放線菌は、抗生物質や生理活性物質の生産菌として重要であり、放線菌を宿主として機能する組換えプラスミドによって抗生物質や生理活性物質の生産量の増大や新規な有用物質の創製の可能性が秘められており、期待されるところが大きく、最近注目されている。そして、抗生物質の

活性の低い放線菌に用いることにより、抗生物質の増産が可能であり、また、新規抗生物質の産生が期待できることを確認し、本発明を完成した。

しかして、本発明によれば、ストレプトマイシンの生合成に関与するATase遺伝子を含有する組換えプラスミドが提供される。

本発明のプラスミドは、ストレプトマイシンの生合成に関与するATase遺伝子を含有するものであればそれが他の種類の抗生物質の生合成に影響を与えるものであってもよい。また、ATase遺伝子の起源としては、ストレプトマイシンの生合成に関与するATase遺伝子を有するものであれば、その種類を問わないが、ストレプトマイシンの生産能を有する微生物の染色体DNAに由来するものが好適に用いられる。これらの具体的なものとしては、ストレプトミセス・グリセウス（*Streptomyces griseus*）ATCC 10137等を挙げることができる。

他方、ベクタープラスミドとしては、放線菌で自律増殖可能であり、かつ、宿主細胞の分裂の際

生産に関する遺伝子をクローン化した具体的な組換えプラスミドとしては、ポリエン系抗生物質キャンディシディン（Candicidin）の生合成に関与するpIJ 800等（例えば、Gene, 25, 119～132頁）や、アクチノローディン（Actinorbdin）についてのpIJ 2303等（例えば、Nature 309, 462～464頁）等が知られている。

発明が解決しようとする問題点

上述のごとく、抗生物質生産に関与する遺伝子のクローニングに関して数件の報告が見られるものの、抗生物質の多様性を考慮すると、いまだ研究の緒についたばかりであるといえる。

問題点を解決するための手段

本発明者らも、抗生物質の生産性に影響をおよぼしうる特定の酵素産生に係る遺伝子を含有する組換えプラスミドを提供すべく研究したところ、ストレプトマイシンの生合成に関与するATase遺伝子を含有するものが、放線菌、例えば、ストレプトミセス・グリセウスでその遺伝子増幅効果を発現するため、ATase活性が欠失するか、または、

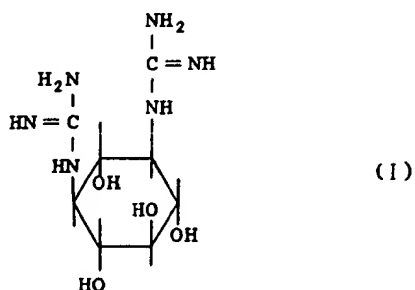
して、安定に娘細胞に受け継がれていく安定保持性に優れたものであればよく、使用する宿主によって自由に選ぶことができる。

これらの具体的なものとしては、本発明者らが提供したプラスミドpOA 11, pOA 15, pOA 23等またはそれらから誘導されるpOA 151～156等（例えばヨーロッパ特許出願公開第115864号公報、特開昭59-143588号公報参照）や、その他公知のpIJ 41（例えばJ. Gen. Microbiol. 129, 1403～1413）、pIJ 61（例えば、Gene, 20, 51～62）等を挙げることができる。就中、本発明の組換えプラスミドによる形質転換体のスクリーニングに適した各種栄養要求性や、特定の抗生物質耐性を付与する遺伝子を含有するものがよく、テトラサイクリン耐性が付与されたpOA 151～156シリーズのプラスミドが好適に用いられる。

しかして、本発明で提供する組換えプラスミドは上述のベクタープラスミドにATase遺伝子がコードされたものであればよく、具体的なものの一例としては、本発明者らがpADT 4と命名したもの

や、更にこれより誘導される pADT 41 や pADT 42 を挙げることができる。

ここに、ストレプトマイシンの生合成に参与する ATase 遺伝子とは、該生合成系でその酵素ステップが明らかにされている次式



で示されるストレプトチジン (Streptidine) の生合成において、2ヶ所のアミディオ化反応を触媒する酵素産生に参与する DNA をいう (例えば、Methods Enzymol. 43, 429~470 頁参照)。

本発明の組換えプラスミドの調製はそれ自体公知の方法によって行うことができるが、ATase 遺伝子としてストレプトミセス・グリセウス ATCC

1523, 1979 参照) により採取できるプラスミド pOA 15 をベクタープラスミドとして用いることができる。また、該プラスミドから薬剤耐性を付与すべく調製されたプラスミド pOA 151, pOA 152, pOA 153, pOA 154, pOA 155, pOA 156 等 (上記ヨーロッパ特許出願公開第 115864 号公報参照) 及びこれらの誘導体の調製法に準じて、放線菌を宿主として使用できる他のプラスミドから調製されたものも同様に用いることができる。なおこれらのうち、プラスミド pOA 152 及び pOA 154 は、上述の pOA 15 と同様に寄託されそれぞれ FERM BP-462 及び FERM BP-463 の寄託番号が付された微生物から上記アルカリ抽出法によって採取することができる。これらのプラスミドは選別標識 (マーカー) として、テトラサイクリン耐性 (以下、「T^r」という) が付与されており、本発明の組換えプラスミドの調製に有利に用いることができる。

(B) ATase 遺伝子のクローニング

上述のストレプトマイシンの生合成に参与する

10137 の染色体 DNA に由来するものであって、ベクタープラスミドとして、pOA 15 より誘導された pOA 154 を用いる場合を例にして概説する。

なお本発明はこれらの例示する発明に限定されるものではない。

組換えプラスミドの調製方法

(A) ベクタープラスミドの調製

ベクタープラスミドとしては、上述のように放線菌で安定に複製増殖維持できるものであれば何でも用いることができるが、それらから使用目的に応じて誘導されるものをも含まれる。

例えば、本発明者らによって工業技術院微生物工業技術研究所に昭和 58 年 1 月 27 日付で寄託され、昭和 59 年 1 月 20 日付で特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき国際寄託に移管され FERM BP-461 にて寄託されているストレプトミセス sp. OA 15 よりそれ自体公知方法、例えばアルカリ抽出法 (rapid alkaline extraction method; Birnboim, H.C., and J. Doly, Nucleic Acids Res., 7, 1513 ~

ATase 遺伝子を含有する微生物、例えば、ストレプトミセス・グリセウスの菌体より、染色体 DNA を SDS - フェノール法 (例えば、K.F. Chater et al., Current Topics in Microbiology and Immunology, 96, 69-95 頁 (1982)) などの公知の方法で抽出する。抽出された染色体 DNA を適当な制限酵素により切断すれば、目的の ATase 遺伝子を含有する DNA 断片が各種の DNA 断片と共に得られる。このようにして得られる DNA 断片混合物から目的の遺伝子含有断片を分離し、またはそれを含有する組換えプラスミドを調製するには、ATase 遺伝子を含有する DNA 断片の末端と結合し得るように処理されたベクタープラスミドへ該断片を組み込み、さらに生成された各種の組換えプラスミドによる宿主菌の形質転換を行った後、目的の形質を発現する形質転換体を選別することにより行うことができる。上記プラスミド pOA 154 を用いる場合を一例として挙げれば、染色体 DNA を制限酵素 Sau 3AI により 1~20 kb の DNA 断片となるように部分分解 (例えば、T. Maniatis et al.,

Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 282 - 283 頁 (1982)) し、得られる該 DNA 断片を、BamHI により切断開環した後ベクターIALアルカリホスファターゼ処理した pOA154 と混合し、更に、 T_4 リガーゼで連結処理し、これにより上記ストレプトミセス・グリセウスの染色体 DNA 断片が導入された目的の組換えプラスミドを含む連結混合物を得る。

連結混合物から目的の組換えプラスミドを選別するには、該混合物をストレプトマイシン生産菌から変異して得られる ATase 欠損株のプロトプラストに Thompson らの方法 (J. Bacteriol., 151, 668 ~ 677 頁, 1982) に従い導入し、R2YE 培地 (同上の文献参照) で再生、孢子着生後、ペルベット布を用いて孢子をテトラサイクリンを含む栄養培地にレプリカし、形質転換体を選択する。次に pTB 90 (Tc^r , Km^r) (特開昭 59-196092 号参照；

但し、 Km^r はカナマイシン耐性) を保持するバシラス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) を含

いずれも上述の組換え方法に準じて行うことができ、かくして、挿入方向の異なる pADT 41 及び pADT 42 等の小型プラスミドが作製できる。

なお、上記選別工程に用いる ATase 欠損変異株は、ストレプトマイシン生産菌をそれ自体公知の紫外線照射法によって変異せしめたストレプトマイシン非生産菌株の中から栄養培地中にストレプトテジンを添加して培養するとき、ストレプトマイシン生産性を回復し、かつその菌体抽出物が ATase 活性を示さないものから取得できる。この具体的なものとしては、本発明者らにより、昭和 60 年 3 月 6 日工業技術院微生物工業技術研究所に、微工研菌寄第 8130 号として寄託されているストレプトミセス・グリセウス SD 141 菌株を挙げることができる。

作用、効果

本発明の作用、効果を pADT 4、並びに、pADT 41、及び pADT 42 を用いて説明する。

[A] pADT 4 による ATase 欠損変異株のストレプトマイシン生産能の回復：

む、Antibiotic Medium Ⅴ (Difco 社製) を、先の栄養培地に重層し、抗菌物質を生産しているクローンを選別する。

選別されるクローンをそれぞれ液体培養した後 ATase 活性を示すものが、本発明の組換えプラスミドを保持するから、これを前述のプラスミド抽出法によってプラスミドを抽出すればベクタープラスミドにストレプトマイシンの生合成に関与する ATase 遺伝子を含む組換えプラスミドを取得できる。かくして、得られる具体的なものとしては第 1 図に示す pADT 4 を挙げることができる。

以上の方法によって創製された組換えプラスミドは使用目的、使用宿主菌に適合させるべくさらに、ハイブリッドプラスミドとし、または小型のプラスミドとすることもできる。これらも本発明の技術的範囲に包含されることは付言するまでもない。本発明の一例である pADT 4 を用いた小型プラスミドの作製について述べる。

第 2 図に示すように pADT 4 の 7.4 kb BglI 断片を pOA 154 の BamHI サイトへ再クローニングした。

それぞれ次の菌株、

(a) ストレプトマイシン生産菌 (*Streptomyces griseus* ATCC 10137)；

(b) 同生産菌のベクタープラスミド pOA 154 による形質転換体；

(c) ATase 欠損変異株 (ストレプトミセス・グリセウス SD 141, FERM P-8130)；

(d) 同変異株の本発明の組換えプラスミド pADT 4 による形質転換体

をテトラサイクリン $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む栄養寒天培地のアガー・ピース (直径 5 mm) で 28℃、4 日培養後、生産されたストレプトマイシンをバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) MI 113 (pTB 90) を被検菌として測定した。

(a) 及び (b) は $0.5 \mu\text{g}/\text{agar piece}$

(c) は非生産、(d) は $3.2 \mu\text{g}/\text{agar piece}$

であった。このことは、pADT 4 が ATase 欠損変異株のストレプトマイシン生産能を回復するのみではなく、これによる形質転換株 (c) が親株の

Streptomyces griseus ATCC 10137 株よりその生

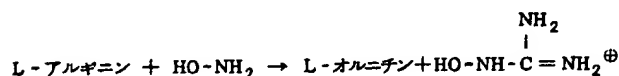
産能を向上せしめうることを示している。

[B] pADT 4, pADT 41 及び pADT 42 保持株の

ATase 活性

pADT 4, pADT 41 及び pADT 42 による ATase 欠損変異株の形質転換体、親菌株等の細胞抽出物 (Cell extract) の ATase 活性を Walker, J.B. の測定法 (Methods Enzymol. 43: 429~470 頁参照) に準じて測定した。

即ち、次の式、



で示される反応に対する各 Cell extract を次の条件 (反応液組成)

1M リン酸カリ緩衝液 (pH 7.4)	0.1 ml
1M L - アルギニン	0.1 ml
2M ヒドロキシルアミン	0.3 ml
Cell extract (約 30~40 μg of protein/ml)	0.5 ml
37℃	

第 1 表より、親株 ATCC 10137 の ATase の比活性は約 0.1 U/ μg of protein であるのに対し、SD141 (pADT4) は、2~3 倍、SD141 (pADT41), SD 141 (pADT42) は、約 6~7 倍に比活性が上昇していた。pADT 4 と pADT 41, pADT 42 の間の差は、pADT 4 がより欠失しやすいためと考えられる。

挿入方向の異なる pADT41, pADT42 ともに、ATase 生産能を SD141 に回復させることは、ATase 遺伝子のプロモーターもクローン化されたことを示唆する。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

実施例 1

pADT 4 の調製方法

ストレプトミセス・グリセウス ATCC 10137 を Trypticase Say Broch (以下 TSB と略す) (BBL Microbiology Systems 製, Cockeysville, Md., USA) に 0.8% のグリシンを加えた培地 100 ml に接種して、28℃ で 2 日間振盪培養を行ない、10,000×10g, 10 分間の遠心で集菌した。こ

で反応させ、生成するヒドロキシグアニジンをペントシアノアミノフェレート ($\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_2]$) で処理し、その呈色反応を OD₄₈₀ の値を測定して ATase の活性を定量した。ATase の 1 ユニットは 37℃, 1 時間反応によって、1 μmol のヒドロキシグアニジンを生成する酵素量とした。結果を第 1 表に示す。

第 1 表

宿主菌	プラスミド	アミディオトランスフェラーゼ活性 (units/ μg of protein) ¹⁾	
		Exp.1	Exp.2
ATCC 10137	None	0.098	0.107
	pOA 154	0.041	0.068
SD 141	None	0.003	0.003
	pADT 4	0.328	0.235
	pADT 41		0.789
	pADT 42		0.602

注 1). 蛋白濃度は Lowry 法 (J. Biol. Chem. 193: 265~275) により、標準として、牛血清アルブミンを用いた。

の菌体からチェイター等の公知の方法 (Curr. Topics Microbiol. Immunol., 96, 69, 1982) に従い、全 DNA を抽出精製し、TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) で透析して供与体 DNA とした。

このようにして得た供与体 DNA 10 μg を、3.9 U の Sau 3A を用いて、10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 100 mM NaCl 中で、37℃ 1 時間反応させることにより、1~20 kb の DNA 断片になるように部分分解した。この反応液に等容のフェノールを加え、1 分間振盪し、10,000×g, 5 分間の遠心後、水層をパスツールピペットで取り出した。DNA を含むこの水層をエチルエーテル抽出に付し、フェノールを除去したのち、2 倍容のエタノールを加え、-20℃ で 1 時間放置後、10,000×g, 5 分間の遠心で DNA を沈澱させた。他方、ベクタープラスミド pOA 154 1 μg を 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 7 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 2 mM 2-メルカプトエタノール, 0.01 % ウシ血清アルブミン中で、6 U の Bam HI により

30℃で1時間反応させることにより完全に切断した。この BamHI で切断された pOA 154 を先のようにエタノール沈澱させた後、沈澱物を 50 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM $MgCl_2$ に溶解させた。これに 0.2 U のバクテリアルアルカラインフォスファターゼを加え、53℃、2時間反応させた後、先のようにフェノール抽出を行なった。フォスファターゼ処理により、DNA の 5' 末端のリン酸が除去され、連結時におけるベクター pOA154 の自己閉環が防げる。

以上のようにして調製した、Sau3A で部分分解した供与体 DNA と BamHI, バクテリアルアルカラインフォスファターゼした pOA 154 を、70 μ l の蒸留水に溶解する。これに、10 倍濃度のリガーゼ緩衝液 (660 mM Tris-HCl, pH 7.6, 66 mM $MgCl_2$), 100 mM ジチオスレイオール, 10 mM ATP を各 10 μ l と T_4 リガーゼ 5.6 U とを加え、12℃、24時間反応させてのちエタノール沈澱して、10 μ l の TE 緩衝液に溶解した。このようにして、pOA 154 と、染色体 DNA との組換え DNA

プロトプラストを沈澱させ、残った少量の PWP 培地に再懸濁した。これに組換え体 DNA 溶液 10 μ l および 0.5 ml のポリエチレングリコール溶液 (2.5 g のポリエチレングリコール #1000 を 7.5 ml の T 培地 [2.5% シュ糖, 14 mM K_2SO_4 , 0.1 M $CaCl_2$, 50 mM Tris-マレイン酸, pH 8.0, 1/500 量微量元素溶液] に溶解し調製する) を加え、1分間室温放置後、PWP 培地 5 ml で希釈し、800 \times g, 10 分間の遠心でプロトプラストを集め、25 ml の PWP 培地に懸濁させた (微量元素の組成 [1 リットル中]: 40 mg $ZnCl_2$, 200 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg $Na_2B_4O_7 \cdot H_2O$, 10 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$)。このプロトプラスト液を 0.1 ml ずつ 250 枚の直径 9 cm 円形プラスチック製ペトリ皿に調製した R2YE 寒天培地 (0.3 M シュ糖, 1.4 mM K_2SO_4 , 50 mM $MgCl_2$, 1% グルコース, 0.01% カザミノ酸, 1/50 量微量元素溶液, 0.4 mM KH_2PO_4 , 20 mM $CaCl_2$, 0.3% プロリン, 25 mM TES 緩衝液, pH 7.2, 5 mM NaOH,

を調製した。

この DNA による ATase 欠損株、ストレプトミセス・グリセウス SD141 株の形質転換は、チェータ等の公知の方法 (Curr. Topics Microbiol. Immunol., 96, 69, 1982) に準じて行なった。すなわち 20 ml の 0.8% のグリシンを含む TSB に、ストレプトミセス・グリセウス SD141 を接種して 28℃で36時間振盪培養を行ない、10,000 \times g の遠心分離で菌糸を集めて、12% シュ糖溶液で1回洗浄したのち、10 ml の P_3 培地 (0.5 M シュ糖, 70 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM $CaCl_2$, 25 mM TES 緩衝液, pH 7.2) に懸濁させた。次いで、最終濃度 1 mg/ml になるように卵白リゾチームを加え、28℃に60分間保温してプロトプラストを形成させた。800 \times g, 7 分間の遠心によって、プロトプラストを沈澱させ、PWP 培地 (0.5 M シュ糖, 70 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM $CaCl_2$, 25 mM TES 緩衝液, pH 7.2) で1回洗浄させたのち、10 ml の PWP 培地に懸濁させた。このプロトプラスト懸濁液 1 ml を遠心で P

0.5% イーストエキスト, 2.2% 寒天) に塗布して、28℃で5日培養した。プロトプラストから再生した寒天培地上の菌を、テトラサイクリン 25 μ g/ml を含む栄養寒天培地にピロード布を用いてレプリカして、28℃、4日間培養した。この結果、総数 16,000 個のテトラサイクリン耐性の形質転換体を得た。これらの形質転換体の中から、抗菌活性物質を生産している株を検索するため、パチルス・サチルス MI 113 (pTB90) の胞子を含むアンテバイオティク 5 培地を栄養寒天培地に重層した。このようにして6個の抗菌活性物質を生産している株を得た。それぞれより、アルカリ抽出法 (Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523, 1973) により調製し、ストレプトミセス・グリセウス SD141 のプロトプラストを再形質転換した。その結果、すべてのプラスミドにおいて、テトラサイクリン耐性の形質転換体は、抗菌物質を生産していることが明らかになった。つまり、それぞれの株の抗菌物質生産能は各プラスミドに支配されていると推定された。次に各プラスミド

を保持するSD141株を100 mlのGMP培地(1% グルコース, 0.2% イーストエキス, 0.2% 肉エキス, 0.4% ポリペプトン, 0.5% NaCl, 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0)に接種し、28℃で48時間振盪培養後、遠心分離で集菌した。この菌体(約1g)に1 mlの蒸留水を加え、超音波破碎の後 $30,000 \times g$ 30分間の遠心分離で細胞抽出液を調製した。この抽出液を用いて、ウォーカーらの方法(Methods Enzymol., 43, 429-470)に従いATase活性を測定したところ、pADT4と名付けたプラスミドを保持するSD141にのみ約0.2~0.3 U/μg蛋白の活性が検出された。なお、ATase欠損株SD141には、ATaseは検出されず、DNAの供与菌であるストレプトミセス・グリセウス ATCC 10137のATase活性は約0.1 U/μg蛋白であった。したがってpADT4にはATase遺伝子がクローン化されたと考えられる。

実施例2

pADT41とpADT42の調製

2 μgのpADT4を、10 mM Tris-HCl (pH 7.5),

7 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 2 mM 2-メルカプトエタノール中で、6 UのBgl IIを用い37℃2時間反応させ、完全に切断させる。このBgl II切断物を0.8%ローメルティング・テンペラチャー・アガロース(40 mM Tris-酢酸(pH 8.0), 2 mM EDTA)を用いて、電気泳動を行なった。出現してくる2つのDNAバンドのうち7.4 kbのBgl II断片を含むアガロースをかみそりによって切り出して、65℃、5分間熱して、アガロースを溶解する(約200 μl)。これに400 μlの50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM EDTAを加えた後、600 μlのフェノールを加えて、フェノール抽出を行なった。10,000 × g, 10分間の遠心後、DNAが存在する水層をとり出し、2倍容のエタノールを加えて、-70℃、2時間放置した。これを10,000 × g 5分間遠心してDNAを沈澱せしめた。この沈澱物に、Bam HIおよびバクテリアル・アルカライン・ファスファターゼ処理したpOA154を1 μgを加え、実施例1のようにT₄リガーゼを用いて連結した。この組換え体DNAをSD141のプ

ロトプラスミドに形質転換し、テトラサイクリン耐性およびストレプトマイシンを生産する株からプラスミドを抽出し、pADT41, pADT42をそれぞれ調製した。

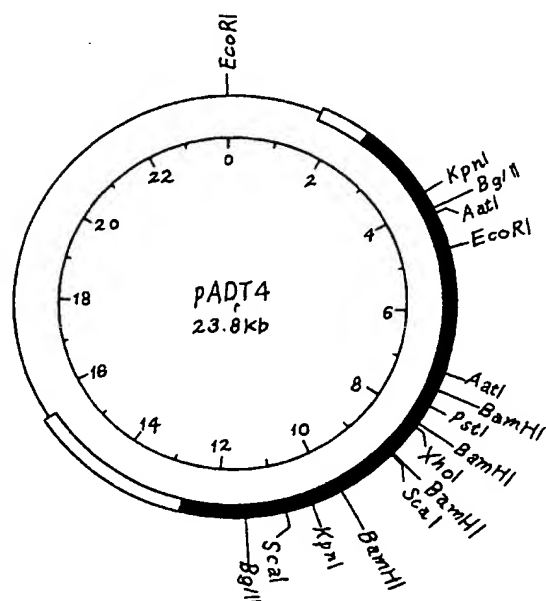
4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例1で得られたプラスミドpADT4の制限酵素地図を表わし、第2図は実施例2に示す、プラスミドpADT4から小型プラスミドpADT41及びpADT42の調製及びそれらの制限酵素地図を表わす。

なお、図中、▽はEcoRI, ▼はBgl II, ◆はBam HIによる切断箇所を示す。

特許出願人 三楽オーシャン株式会社

第 1 図



第 2 図

